

## Fas 抗原を介するアポトーシスにおける 細胞周期関連蛋白および細胞動態の解析

小 栗(百町)直 美

札幌医科大学医学部眼科学講座 (主任 中川 喬 教授)

高 橋 秀 史

札幌医科大学医学部病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

### Analysis of Cell Cycle-Associated Proteins and Cell Kinetics in Fas-Mediated Apoptosis

Naomi OGURI-HYAKUMACHI

*Department of Ophthalmology, Sapporo Medical University, School of Medicine*  
(Chief : Prof. T. NAKAGAWA)

Shuji TAKAHASHI

*Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical University, School of Medicine*  
(Chief : Prof. K. KIKUCHI)

**ABSTRACT** The Fas antigen is a cell surface protein that can mediate apoptosis in a variety of cell types, including the human leukemia T cells. We previously demonstrated that the Fas-resistant variants may exist in highly Fas-sensitive human leukemia T-cell lines. The surface expression of Fas antigen was unchanged in the variant cells, suggesting a defective intracytoplasmic mechanism leading to apoptosis. We found that the stimulation of Fas-sensitive cells (SUP-T13) with anti-Fas antibody 2D1, but not resistant variants (LAC2D1R), induced repression of p34cdc2 and p33cdk2 along with apoptosis. There were no alterations in expression of bcl-2, HSP70, HSP90 and cyclin proteins examined. In the present study, we also examined the changes in other cell cycle-related proteins such as Rb and ubiquitin. We observed an increase of unphosphorylated Rb and of polymerization of ubiquitin after stimulation with 2D1 in a time-dependent fashion on SUP-T13. Similar results, that is, repression of p34cdc2 and p33cdk2, an increase of unphosphorylated Rb and an increase of polymerization of ubiquitin after stimulation with 2D1 were obtained from other Fas-sensitive cell lines such as Jurkat cells. Furthermore, we examined the relationship between cell cycle perturbation and cell killing. Interestingly, after stimulation with 2D1, Fas-sensitive cells (SUP-T13) incorporated as much bromodeoxyuridine as Fas-resistant cells (LAC2D1R) did, suggesting that SUP-T13 induced apoptosis after entering into the S phase of the cell cycle. Moreover, in histograms obtained from flow cytometric analysis of DNA with propidium iodide, there were no changes in the ratio of cells in the G1, S or G2/M phase in SUP-T13 stimulated with 2D1. In conclusion, our results suggest that Fas-mediated apoptosis may occur in any phase of the cell cycle and that depletion of p34cdc2 and p33cdk2 and an increase of unphosphorylated Rb are involved in the specific mechanism of Fas-mediated apoptosis, which is considered to be mediated by the ubiquitin-dependent proteolytic system. In addition to investigating the expression of intracytoplasmic proteins in activated human lymphocytes, we confirmed that Fas-sensitivity was expressed when the

cyclin kinases such as p34cdc2 and p33cdk2 were expressed sufficiently and the proliferative effect was enhanced. Furthermore, as an anti-CD3 mAb, EF6, reversed the antiproliferative effect of the anti-T cell receptor mAb LC4, but not that of 2D1, Fas-mediated apoptosis seemed to be independent of TcR-mediated apoptosis. (Received October 13, 1995 and accepted December 6, 1995)

**Key words:** Fas antigen, Apoptosis, Cell cycle

## 1 結 言

細胞死は、壊死とアポトーシスの2種類に大別される。壊死は、物理的ならびに化学的要因、虚血および補体の作用によって障害された細胞に見られる受動的細胞死である。これに対しアポトーシスは、生体にとって不必要になった細胞が排除される際に誘導される生理的細胞死である。元来、発生学領域で自殺機構による細胞の死を形態学的にアポトーシスと呼んでいたが、最近、免疫系においては自己反応性 T 細胞や B 細胞が細胞死で除かれるクローン除去という現象や、活性化成熟 T 細胞のネガティブフィードバックなどがアポトーシスによるものであることが明らかとなった。このように、生体の恒常性維持にアポトーシスが重要な役割を果たすことが知られている<sup>1,2)</sup>。T 細胞にアポトーシスを導く刺激としては、T 細胞抗原レセプター(TcR)、グルコルチコイド、カルシウムイオノフォア、放射線、サイトカインの刺激あるいは離脱および細胞表面分子 Fas/APO-1 を介する刺激などが示されており<sup>3-13)</sup>、胸腺では TcR を介するアポトーシスが自己反応性 T 細胞のネガティブ選択を行って自己反応性クローンを除去し自己免疫疾患の誘起から逃れている。Fas 抗原遺伝子の変異が異常 T 細胞の蓄積や自己免疫疾患をおこすことが明らかとなり、Fas 抗原は T 細胞の増殖および分化過程で重要な役割を担っていることが示唆された<sup>14)</sup>。しかし、Fas 抗原を介するアポトーシスの機序やその制御機構は明らかになっていない。

ヒト白血病性 T 細胞株 SUP-T13 は、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 未熟胸腺細胞の表面抗原形質を有し、TcR 刺激、放射線およびカルシウムイオノフォアなどによるアポトーシス感受性が高いことから、アポトーシスの刺激伝達機構の解析に有用と考えられた<sup>4)</sup>。そこで、SUP-T13 にアポトーシスを起こす単クローン抗体 2D1 を作製したところ、この抗体は Fas/Apo-1 抗原を認識していた<sup>15)</sup>。さらに、Fas 感受性ヒト白血病性 T 細胞株から Fas 耐性株を樹立したところ、耐性株では細胞表面上の Fas 抗原の発現が原培養株と同等であったことから、細胞内のシグナルの欠損あるいは抑制が示唆された<sup>15)</sup>。こ

れらの細胞を比較することにより、Fas 抗原を介するアポトーシスの分子機構の解析が可能になると考えた。bcl-2 遺伝子の導入により、胸腺細胞における抗 CD3 抗体やグルコルチコイドおよび放射線照射等の刺激によるアポトーシスが抑制されるなど、bcl-2 蛋白の高発現がアポトーシスを抑制することが示されている<sup>16-19)</sup>。しかし、私共の系では、Fas 感受性細胞と Fas 耐性株ともに抗 Fas 抗体の刺激前後において bcl-2 の発現は一定であったことから、これらの細胞における Fas 感受性の違いは bcl-2 の発現では説明されない<sup>15)</sup>。そこで、ヒト T 細胞におけるアポトーシスを抑制すると報告された熱ショック蛋白<sup>20)</sup> および細胞増殖の抑制活性をもつリン酸化蛋白質の癌抑制遺伝子産物 Rb<sup>21)</sup> など、別の細胞内蛋白の関与が考えられた。さらに、Fas 抗原は末梢リンパ球ではほとんど発現していないが、PHA や抗 CD3 抗体による刺激で誘導される活性化抗原であること<sup>11,12,15)</sup>、また、T 細胞白血病株など腫瘍化に伴って構成的に発現していること<sup>15)</sup> などから、細胞の増殖と Fas 抗原を介するアポトーシスの感受性に関連が示唆され、p34cdc2 や p33cdk2 などのサイクリンキナーゼ<sup>21-23)</sup> についても検討する必要があると考えられた。そこで、Fas 感受性ヒト白血病性 T 細胞株と Fas 耐性株および正常 T 細胞における Fas 刺激に伴うこれらの細胞内蛋白の発現を Western blotting 法で比較検討し、さらに、Fas 刺激に伴う細胞周期の変化を flow cytometry (FCM) を用いて検討した結果、知見を得たので報告する。

## 2 実験材料および方法

### 2.1 使用細胞

ヒト白血病性 T 細胞株 SUP-T13 および Jurkat を用いた。また、当教室において、SUP-T13 および Jurkat から各々分離樹立された Fas 耐性株、LAC2D1R および JKT2D1R も用いた<sup>15)</sup>。細胞は、10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum) (Summit, U. S. A.)、100 units/ml ペニシリン G、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンおよび 2 mM-グルタミン(以上 Gibco, Grand Island, New York, U. S. A.) を含む RPMI 1640 (Sig-

ma, St. Louis, MO) 培養液 CM に浮遊し、炭酸ガス培養器 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) にて培養した。

## 2・2 単クローン抗体 (mAb) および抗血清

当教室で分離樹立した抗 Fas 抗体, 2D1 (IgM)<sup>4)</sup>, 抗 T cell receptor (TcR) 抗体 LC4 および抗 CD3 抗体 EF6 を用いた。ヒト bcl-2 蛋白に対する抗 bcl-2 抗体 (clone 124, IgG1) およびヒトユビキチン蛋白に対する抗ユビキチン抗体は Dako, Glostrup, Denmark, ヒト p34cdc2 蛋白に対する抗 p34cdc2 抗体 (clone Bcdc 2.1, IgG2a) は Boehringer Mannheim Biochemica, 東京, ヒト p33cdk2 蛋白に対する抗 p33cdk2 抗体は Upstate Biotechnology, Inc., New York, ヒト HSP70 蛋白に対する抗 HSP70 抗体 (clone 3a3, IgG1) は Affinity Bioreagents, Neshanic station, NJ, ヒト Rb 蛋白に対する抗 Rb 抗体 (clone PMG3-245, IgG1) は Pharmingen, San Diego, CA., U. S. A., 二次抗体として使用したビオチン標識抗マウス IgG+IgA+IgM 抗体およびビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体はニチレイ, 東京, またホスファターゼ標識ストレプトアビジンおよびフルオレスセイン・イソチオシアン酸 (fluorescein, isothiocyanate, FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG+IgM は Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD よりそれぞれ購入した。

## 2・3 MTT 法

MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium promide] (Sigma) を用いた生細胞測定は既報<sup>24)</sup> に準じて行った。1~4×10<sup>4</sup> の細胞を 96 well 底のマイクロプレート (Falcon No. 3072, Becton Dickinson, Mountain View, CA) に 10 μg/ml の mAb を含んだ CM に浮遊し 37°C で培養した。3 日後, MTT 溶液 5 mg/ml を 10 μl/well で加えると, 生細胞ではミトコンドリアの酵素作用により formazan 結晶が形成された。この結晶を 0.04 N 塩酸加イソプロパノールを加えることにより溶解した。各 well の吸光度を multiple scanning photometer (MicroELISA MR600, Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) を用いて測定した。測定波長は 570 nm, reference は 630 nm とした。増殖率は以下の計算式にて算出した。

%増殖率 = (1 - 抗体存在下の吸光度/培養液のみでの吸光度) × 100

## 2・4 Western blotting 法による 細胞内蛋白の検出

1×10<sup>6</sup> 個あたり 100 μl の割合で lysis buffer (1.0% NP40, 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, 140 mM NaCl,

1mM PMSF, mg/ml pepstatin, 0.05% sodium azide, 1% aprotinin, 5 mM EDTA) を加え 4°C, 30 分間静置し, 15000 g で 20 分間遠心することにより cell lysate を得た。この cell lysate に sample buffer (3% SDS, 10% glycerol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8) を加え, 5 分間沸騰し試料とした。電気泳動は 8%あるいは 12%の sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて行い, 分離された 5×10<sup>6</sup> 個細胞相当の蛋白質は電気泳動転写装置 (セミドライプロット) (Bio-Rad Japan, 東京) を使用し, イモビロンメンブレン (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写した。このイモビロンメンブレンをブロッキング用緩衝液 (5% skim milk, 0.05% Tween-20, 50 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.01% NaN<sub>3</sub>, pH 8.0) に室温で 1 時間浸透し, 各々の一次抗体を室温で 1 時間反応させた。更にビオチン標識抗マウス IgG+IgA+IgM 抗体またはビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (ニチレイ, 東京) とホスファターゼ標識ストレプトアビジン (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) をそれぞれ室温で 1 時間反応させた後, BCIP/NBT ホスファターゼ基質 (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) で抗原を検出した。

## 2・5 flow cytometry (FCM) を用いた細胞動態の解析

### 2・5・1 蛍光抗体による細胞表面抗原の FCM について

5×10<sup>5</sup> 個の各種細胞に, 一次抗体として 10 μg/ml の mAb を加えて 4°C, 30 分反応させ, 燐酸緩衝液 (Phosphate Bufferd Saline, PBS) で洗浄後, 二次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG+IgM (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) を加え 4°C, 30 分反応させた。これを PBS で洗浄後, 1%ホルムアルデヒドを含む PBS で固定し, fluorescence-activated cell sorter (FACStar, Becton Dickinson) で解析を行った。

### 2・5・2 bromodeoxyuridine (BrdU) 標識法

培養中の細胞 (2~5×10<sup>4</sup>/2 ml) に 10 μM の BrdU (Amersham Japan, 東京) を加え, 30 分間のパルスラベルを行った。細胞を遠沈 (1500 rpm, 5 分) し PBS で洗浄後, -20°C 冷 70%エタノールで 30 分以上固定した。固定した細胞を PBS で洗浄し, 4 N HCl で 30 分間室温処理し DNA 変性を行い, 0.1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (pH 8.5) で 10 分間中和させたのち PBS で洗浄した。0.5% NP40/PBS を加え遠沈後, 抗 BrdU-FITC 抗体

(Cymbus Bioscience Limited, Southampton)を加え室温で30分間反応させ、fluorescence-activated cell sorter (FACStar, Becton Dickinson)を用いて解析を行った。

### 2・5・3 propidium iodide (PI) 染色法

細胞を遠沈しPBSで洗浄後、4°Cの70%メタノールで30分以上固定し、PBSで洗浄後、1 mg/ml RNaseで37°C30分間処理しRNAの消化を行った。PBSで洗浄し、50 µg/mlのPI溶液(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を加え4°C、30分間遮光の上DNA染色を行いFCM用の試料とした。

### 2・5・4 TUNEL Fluorescein-propidium iodide (PI) 二重染色法

Eppendorfで $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 個の細胞をPBSで洗浄後、4% paraformaldehydeに浮遊し、室温で30分間固定した。これをPBSで洗浄し、0.1% TTX, 0.1% sodium citrateにて4°C、2分間反応させ細胞透過性を高めた。PBSで洗浄後、In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)を用い、TUNEL reaction mixtureおよびLabel Solutionを各々加え、37°C、1時間反応させた。その後、2・5・3の如くPI染色を行い試料を作製し、FACStarを用いて解析を行った。

### 2・6 単核細胞の分離、培養および活性化

健康成人よりヘパリン加静脈血を採取し、Ficoll-Conray液(比重1.082)に重層し、比重遠心法により単核細胞を分離回収した。さらに、ナイロンウールを用い癒着細胞成分を除去した。分離された単核細胞は100 U/mlのrIL-2(塩野義製薬、東京)および2 µg/mlのPHA-P(Honen corporation, 東京)存在下、AIM-V培養液(Gibco, Grand Island, New York)に浮遊し炭酸ガス培養器(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)にて培養した。

## 3 結 果

### 3・1 Fas感受性細胞とFas耐性株における抗TcR抗体と抗Fas抗体刺激による増殖抑制

SUP-T13にはTcR陽性と陰性の細胞が混在しており、TcRの存在に拘わらず全ての細胞がFas刺激によってアポトーシスを起こすため、Fas抗原を介するアポトーシスがTcRに依存しないことは明らかである<sup>15)</sup>。一方、抗TcR抗体LC4はFas感受性細胞SUP-T13にアポトーシスを起こす<sup>3-5)</sup>。そこで、SUP-T13とそのFas耐性株LAC2D1RにおけるLC4に対する感受性

を比較検討した。そこで、まず、SUP-T13, LAC2D1Rをlimiting dilution(限界希釈法)でクローニングし、各々から90%TcR陽性細胞を得た。これらの細胞を用い、MTT法にて抗TcR抗体LC4と抗Fas抗体2D1によるアポトーシスを比較検討した(Fig. 1)。LC4によるTcR刺激では、SUP-T13とLAC2D1Rともにアポトーシスにより増殖が抑制されたが、抗CD3抗体EF6によってその増殖抑制は解除された<sup>4)</sup>。一方、Fas刺激では、EF6の存在に拘わらずSUP-T13では増殖抑制が認められ、LAC2D1Rでは増殖抑制が殆ど認められない。したがって、Fas感受性に拘わらずSUP-T13とLAC2D1RはともにTcR刺激によって増殖が抑制されたことから、Fas抗原を介するアポトーシスとTcRを介する経路は互いに独立した機序によると考えられた。また、SUP-T13とLAC2D1Rの系がFas抗原特異的なアポトーシス機構の解析に適し

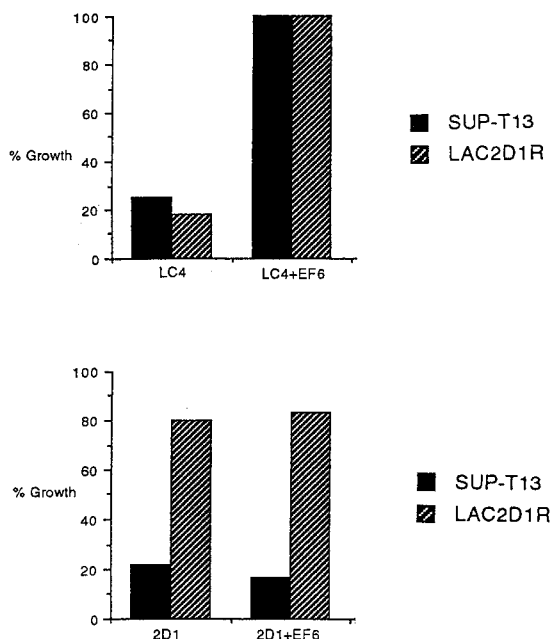


Fig. 1 Anti-proliferative effects LC4 and 2D1 on Fas-sensitive SUP-T13 cells and Fas-resistant LAC2D1R variants. An anti-T cell receptor (TcR), LC4, induced apoptosis in SUP-T13 and LAC2D1R, and an anti-CD3 mAb, EF6 reversed the growth inhibition and apoptosis caused by LC4. However, an anti-Fas antigen (2D1) caused apoptosis of SUP-T13 regardless of the presence of EF6, but did not do so for LAC2D1R. In this system, it seemed that Fas-mediated apoptosis was independent of TcR-mediated apoptosis in SUP-T13.

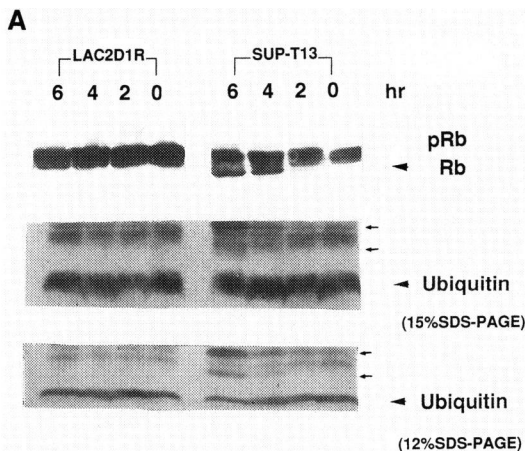
ていることが確認された。

### 3・2 Fas 抗原を介するアポトーシスに伴う細胞周期関連蛋白の変化

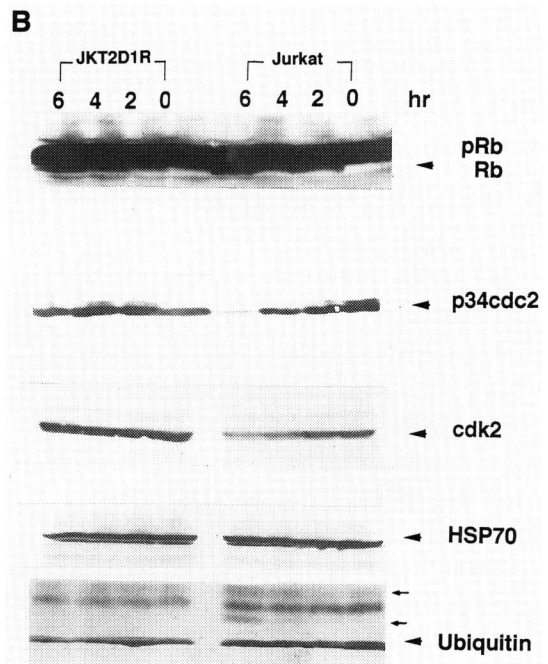
#### 3・2・1 Fas 感受性細胞と Fas 耐性株における抗 Fas 抗体刺激に伴う細胞周期関連蛋白の変化

さきに私共は、Fas 抗原を介するアポトーシスにおける細胞周期関連蛋白などの細胞内蛋白の関与を調べるため、Fas 感受性細胞と Fas 耐性株を抗 Fas 抗体 2D1 で刺激し、p34cdc2 や p33cdk2, HSP およびサイクリンなどの発現の経時変化を Western blotting 法で検討した<sup>25)</sup>。Fas 感受性細胞 (SUP-T13) では経時的に p34cdc2 と p33cdk2 の減少が認められたが、Fas 耐性株 (LAC2D1R) では認めなかったことを報告した<sup>25)</sup>。今回さらに、SUP-T13 と LAC2D1R における細胞周期関連蛋白 Rb とサイクリンキナーゼの制御因子であるユビキチンについて検討した (Fig. 2A)。SUP-T13 を 500 ng/ml の 2D1 で刺激したところ、2 時間後から脱リン酸化された Rb の増加が認められたが、LAC2D1R では認めなかった。さらに、SUP-T13 では Fas 刺激に伴ってユビキチン化蛋白の増加が示されたが (矢印)、LAC2D1R では示されなかった。また、別の Fas 感受性細胞 (Jurkat) および Fas 耐性株 (JKT2D1R) においても同条件下で比較検討したところ (Fig. 2B)、Jurkat においてのみ p34cdc2 と p33cdk2 の減少が 2 時間

後から経時的に認められ、JKT2D1R では認めなかった。HSP70 の発現は両細胞とも刺激前後で一定であった。さらに、Jurkat では Fas 刺激 2 時間後から脱リン酸化された Rb の増加およびユビキチン化蛋白の増加 (矢印) が認められたが、JKT2D1R では認めなかった。Jurkat で認められた Fas 刺激に伴った p34cdc2 と p33cdk2 の減少、Rb の脱リン酸化およびユビキチン化蛋白の増加は、SUP-T13 における結果と同様であったことから、Fas 感受性細胞に普遍的に見られる現象と考えられた<sup>25)</sup>。以上より、p34cdc2 と p33cdk2 の減少および Rb の脱リン酸化が、Fas 抗原を介するアポトーシスに関与



**Fig. 2A** Western blotting analysis of intracytoplasmic proteins in SUP-T13 and LAC2D1R after stimulation with 2D1. Note that the increased expression of both unphosphorylated Rb and polymerization of ubiquitin (arrows indicate ubiquitinated proteins) in SUP-T13, but not in LAC2D1R, started 2 hours after incubation with 2D1 (500 ng/ml).



**Fig. 2B** Western blotting analysis of intracytoplasmic proteins in Jurkat and JKT2D1R cells after stimulation with 2D1. Note that the decreased expression of both p34cdc2 and p33cdk2 in Jurkat cells, but not in JKT2D1R cells, started 2 hours after incubation with 2D1 (500 ng/ml), whereas, there were no changes in the expression of HSP70 in the course of experiment, as with the changes occurring in SUP-T13 and LAC2D1R<sup>25)</sup>. Furthermore, note that the increased expression of both unphosphorylated Rb and polymerization of ubiquitin (arrows indicate ubiquitinated proteins) in Jurkat cells, but not in JKT2D1R cells, started 2 hours after incubation with 2D1 (500 ng/ml), as with the changes occurring in SUP-T13 and LAC2D1R in Fig. 2A.

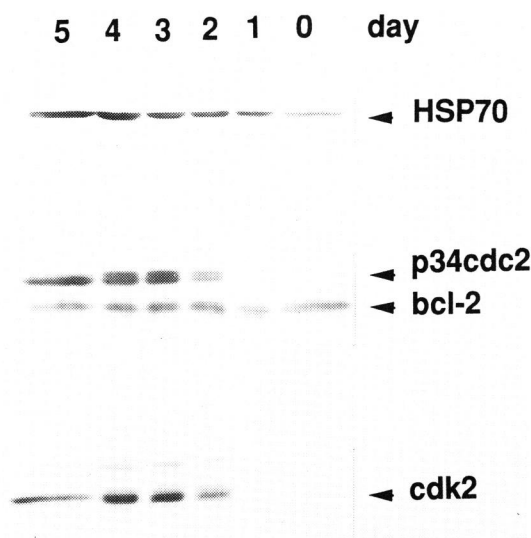


Fig. 3 Western blotting analysis of intracytoplasmic proteins in human lymphocytes cultured in the presence of IL-2 and PHA-P. Note that the expression of both p34cdc2 and p33cdk2 started two days after incubation with IL-2 (100 units/ml) and PHA-P (2  $\mu$ g/ml).

していることが強く示唆された。また、その機序としてユビキチン依存性プロテアーゼの関与が考えられた。

### 3・2・2 正常ヒト活性化 T 細胞における細胞周期関連蛋白の発現および Fas 抗原発現

正常ヒト T 細胞には Fas 抗原の発現がないが、抗原刺激による活性化によって Fas 抗原を発現する。しかし、刺激後 1~2 日目では Fas 抗原の発現を示しても抗 Fas 抗体による増殖抑制はうけず、活性化後 3 日目以降に抗 Fas 抗体でアポトーシスを起こすようになる<sup>26,27)</sup>。正常ヒト T 細胞を PHA-P で刺激することにより活性化後の細胞周期関連蛋白の発現を調べたところ、p34cdc2 や p33cdk2 などのサイクリンキナーゼは正常ヒト T 細胞では発現していないが、PHA-P 刺激後 2 日目より Western blotting 法によって検出可能となった (Fig. 3)。一方、bcl-2 と HSP70 は刺激前後共に発現されていた。次に、正常ヒト T 細胞における PHA-P 刺激による Fas 抗原の発現を確認するため FCM にて検討したところ、PHA-P 刺激後 1 日目から Fas 抗原の発現が認められ、4 日目では最も強く認められた (Fig. 4)。以上の結果は、正常ヒト T 細胞の活性化後 Fas 抗原の発現にも拘わらず Fas 非感受性の時期があり、p34cdc2 などの十分な発現がおき増殖活性が高くなってから Fas 感受性が発現することを示唆するものと考え

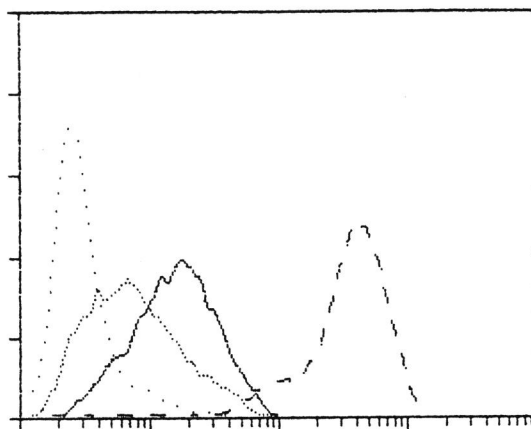


Fig. 4 FCM analysis of Fas expression in activated lymphocytes. Lymphocytes cultured with IL-2 (100 units/ml) and PHA-P (2  $\mu$ g/ml) were stained with 2D1 (—), anti-transferrin receptor mAb (·····) or anti-class I Ab w6/32 (---) and a fluorescein-conjugated secondary antibody before flow cytometric analysis as described under Materials and Methods.

られた。

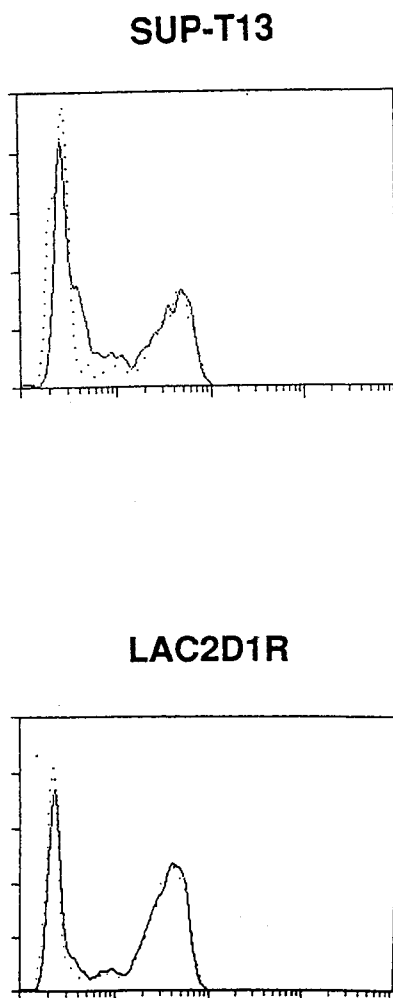
### 3・3 アポトーシス刺激後の細胞動態の解析

#### 3・3・1 Fas 感受性細胞と Fas 耐性株における抗 Fas 抗体刺激前後の BrdU の取込み

Fas 感受性ヒト白血病性 T 細胞株においてアポトーシスに伴い細胞周期関連蛋白の p34cdc2 と p33cdk2 の減少が示され、これらのサイクリンキナーゼの減少が Fas 抗原を介するアポトーシスに関与していることが明らかとなったことから、Fas 抗原を介するアポトーシスと細胞周期との関連を調べる目的で、Fas 感受性細胞と Fas 耐性株における抗 Fas 抗体 2D1 刺激前後の細胞動態の変化を FCM により解析した (Fig. 5A)。DNA 合成に伴って取り込まれ、S 期の細胞を同定する BrdU を用いて検討したところ、Fas 感受性細胞では 2D1 刺激前 37%、2D1 刺激後 39%、Fas 耐性株では 2D1 刺激前 57%、2D1 刺激後 57%であり、ともに 2D1 刺激前後において BrdU を取り込んだ S 期の細胞の量に差は認められなかった。したがって、Fas 抗原を介するアポトーシスでは G1 期停止は起きず、S 期に入った後アポトーシスに至ると考えられた。

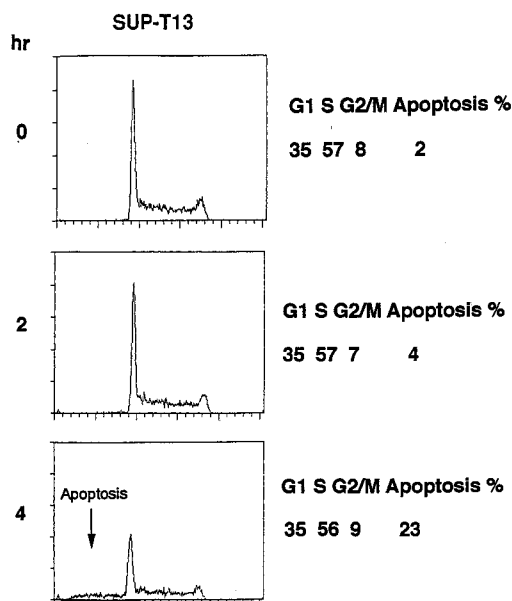
#### 3・3・2 Fas 感受性細胞における抗 Fas 抗体刺激に伴う DNA ヒストグラムの変化

Fas 刺激によるアポトーシスと細胞周期との関連を検討するために、PI による DNA 染色にて Fas 感受性細胞における抗 Fas 抗体 2D1 刺激に伴う DNA ヒストグ

**A**

**Fig. 5A** FCM analysis of incorporation of BrdU in SUP-T13 and LAC2D1R before (.....) and after incubation with 2D1 for 2h (—). A similar amount of BrdU was incorporated in both SUP-T13 and LAC2D1R regardless of stimulation with 2D1 mAb (500 ng/ml).

ラムを FCM により解析した (Fig. 5B). 2D1 刺激に伴いアポトーシスをおこした死細胞が 2 時間後で 4%, 4 時間後で 23% と増えてきているが (矢印), 2D1 刺激前, 刺激後 2 時間および 4 時間でも G1, S および G2/M 期における細胞の割合に変化は認められなかった. 以上の結果からも, BrdU の取込みによる解析の結果と同様に, Fas 刺激による細胞周期の逸脱は起きず, Fas 抗原を介するアポトーシスは細胞周期とは無関係に誘導さ

**B**

**Fig. 5B** FCM analysis of DNA histograms from SUP-T13 after incubation with 2D1 for the indicated periods. Apoptotic cells increased following 2D1 (500 ng/ml) stimulation. (Apoptotic cells are indicated by arrows.) There were no changes in the ratio of cells in the G1, S or G2/M phases in the course of the experiment.

れることが示された.

### 3・3・3 Fas 感受性細胞における抗 Fas 抗体刺激に伴う細胞動態の二重染色法による解析

Fas 刺激と細胞周期の関係を確かめるために, Fas 感受性細胞における抗 Fas 抗体 2D1 刺激に伴う細胞動態の変化を二重染色法を用い, FCM により解析した (Fig. 6). 2D1 刺激 6 時間後, 24 時間後で TUNEL Fluorescein 陽性細胞が認められた. また, Propidium Iodide 陽性の断片化した核も増加しており, アポトーシスを起こした死細胞が増えていることが認められた. これらの変化は G1, S および G2/M 期に依存することなく細胞周期のいずれの時期にも認められた. 以上の結果は, BrdU の取込みおよび PI 染色を用いた DNA ヒストグラムによる解析の結果と一致し, Fas 刺激による細胞周期の逸脱は起きず, Fas 抗原を介するアポトーシスは細胞周期とは無関係に誘導されることが確認された.

## 4 考 察

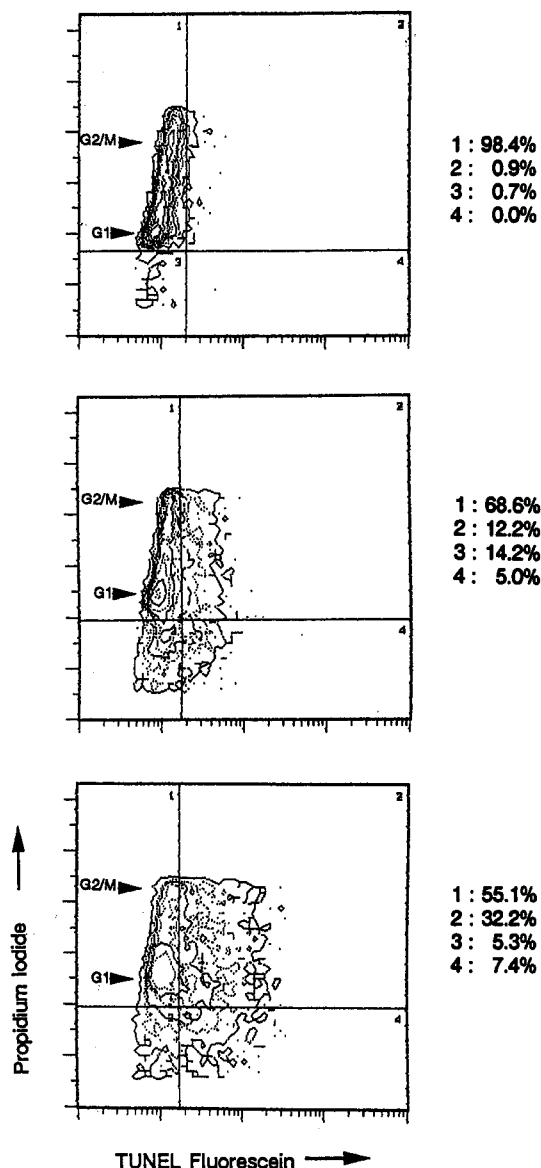


Fig. 6 FCM analysis of double staining with TUNEL fluorescein and Propidium Iodide in SUP-T13 after incubation with 2D1. Top is before stimulation with 2D1, middle and bottom are after incubation with 2D1 for 6h and for 24h, respectively. Apoptotic cells are indicated with positive TUNEL fluorescein and subnuclear DNA stained with Propidium Iodide. Apoptotic cells increased following 2D1 (1  $\mu$ g/ml) stimulation independent of G1, S or G2/M phases in the course of the experiment.

Fas 抗原はアポトーシスを選択的に誘導する細胞表面抗原として明らかにされ<sup>13)</sup>, 生体内にリガンドが存在し Fas 抗原と結合することでアポトーシスを誘導することが報告された<sup>28)</sup>. しかし, Fas 抗原を介するアポトーシスのシグナル伝達機構は未だ明らかではない. T 細胞におけるアポトーシスの誘導機構の一つである T 細胞抗原レセプター (TcR) と Fas 抗原を介するアポトーシス刺激伝達機構とを比較検討したところ, Fas 感受性細胞 (SUP-T13) と Fas 耐性株 (LAC2D1R) は Fas 感受性の違いに拘わらずともに LC4 による TcR 刺激によって増殖が抑制されたことから, Fas 抗原を介するアポトーシスと TcR を介する経路は互いに独立した機序によると考えられた. また, SUP-T13 と LAC2D1R の系が Fas 抗原特異的なアポトーシス機構の解析に適していることが確認された. これらの細胞において, 抗 Fas 抗体 2D1<sup>15)</sup> を用い, Fas 抗原を介するアポトーシスにおける細胞周期関連蛋白などの細胞内蛋白の関与を Western blotting 法で調べたところ, 抗 Fas 抗体の刺激前後において SUP-T13 と LAC2D1R とともにアポトーシスに抑制的に機能する bcl-2<sup>6-19)</sup> や熱ショック蛋白 (HSP70, HSP90)<sup>20)</sup> およびサイクリンの発現は一定であったが, p34cdc2 と p33cdk2<sup>21-23)</sup> の減少が SUP-T13 においてのみ観察された<sup>25)</sup>. さらに今回, これらのサイクリンキナーゼにより活性制御をうけているリン酸化蛋白質の癌抑制遺伝子産物 Rb<sup>21)</sup> について検討したところ, SUP-T13 においてのみ抗 Fas 抗体刺激に伴って脱リン酸化された Rb の増加が観察された. また, これらの結果は, 別の Fas 感受性細胞 (Jurkat) と Fas 耐性株 (JKT2D1R) においても同様に認められたことから, p34cdc2 と p33cdk2 の減少および Rb の脱リン酸化が Fas 抗原を介するアポトーシスに関与していることを強く示唆するものと考えられた.

一方, ヒト末梢 T 細胞を PHA-P で刺激後 IL-2 で培養し, p34cdc2 と p33cdk2 が発現するまでに時間が要することを確認した. これらの事実, 1) T 細胞の活性化後, Fas 抗原の発現にも拘わらず Fas 非感受性の時期があり, p34cdc2 などの十分な発現がおき増殖活性が高くなってから Fas 感受性が出現する<sup>26,27,29)</sup>, 2) 腫瘍免疫において, Fas 抗原を介する細胞傷害が示されており, 増殖活性の高い腫瘍がキラー T 細胞によるアポトーシスを起こしやすい<sup>30)</sup> などの報告を裏付けるものと考えられる.

さらに, 正常ヒト活性化 T 細胞を用いて, 非腫瘍性



T 細胞においても Fas 感受性ヒト白血病性 T 細胞株で示されたように、抗 Fas 抗体刺激に伴う p34cdc2 と p33cdk2 の特異的な減少が誘導されるか検討中である。

最近、リンパ球のプロテアーゼであるフラグメンチン 2 が、通常 G2/M 期に活性化される p34cdc2 を G1 期に活性化しアポトーシスを起こすことが示された<sup>31)</sup>。これらの事実より、細胞周期の失調によりアポトーシスが誘導されるという考えが示されている。しかし一方で、胸腺細胞のアポトーシスには必ずしも p34cdc2 の活性化は必要とされなかったという報告もある<sup>32)</sup>。アポトーシス誘導には p34cdc2 の変調に依存する機構と依存しない機構が存在し、それは、細胞の種類や分化程度などにより異なるものであると考えられた。

bcl-2 は種々の系でアポトーシスを抑制することが示されたが<sup>16-19)</sup>、一方で、bcl-2 によって制御されないアポトーシスがあることも明らかになっている<sup>33,34)</sup>。例えば、bcl-2 の cDNA を導入されたトランスジェニックマウスでは、胸腺細胞が抗 CD3 抗体やグルココルチコイドおよび放射線照射等の刺激に対して感受性が低下しアポトーシスを起こしにくくなるが、T 細胞の負の選択はほぼ正常であり、また、IL-2 依存 T 細胞の IL-2 離脱によるアポトーシスも抑制されない。

また、p53 遺伝子を欠損したトランスジェニックマウスから得られた胸腺細胞では、T 細胞の負の選択やグルココルチコイドによるアポトーシスはほぼ正常であるが、放射線照射によるアポトーシスは抑制されている<sup>35,36)</sup>。これらのことから、アポトーシスの最終像は形態学的には同じであるが、その経路は複数存在すると推測される。今回の実験結果から、p34cdc2 と p33cdk2 の減少および Rb の脱リン酸化が Fas 抗原を介するアポトーシスに関与していることが強く示された。サイクリンキナーゼが減少することの詳細なメカニズムについてはまだ不明であるが、サイクリンキナーゼはユビキチン依存性プロテアーゼによって分解されと考えられ<sup>37,38)</sup>、Fas 刺激に伴ってユビキチン化蛋白の増加が示されたことから、その機序としてユビキチン依存性プロテアーゼの関与も考えられた。また、細胞質内蛋白の核内移行の可能性も考えられ、今後の課題として残された。

真核生物の細胞周期の主要な調節は、G1/S および G2/M の両移行点において行われている。G2 期から M 期への移行および G1 期から S 期への移行の制御は、各々 cdc2, cdk2 キナーゼの活性化およびその酵素による各種基質蛋白質のリン酸化を介して行われている<sup>21-23)</sup>。今回、抗 Fas 抗体の刺激前後における BrdU

の取込みを FCM を用いて検討したところ、Fas 感受性細胞と Fas 耐性株ともにアポトーシス刺激に拘わらず BrdU を取込んだ細胞数に差は認められず、Fas 感受性細胞も S 期に入っていることが示された。抗 Fas 抗体刺激後の PI による DNA ヒストグラムにおいても、アポトーシスをおこした subnuclear DNA 以外の G1, S および G2/M 期の細胞の割合に変化は認められなかった。以上のことから、Fas 抗原を介するアポトーシスは特定の細胞周期に依存しないことが示唆された。p34cdc2 や p33cdk2 が減少しているにも拘わらず細胞周期が進行していることから、G2/M 期、G1/S 期における p34cdc2 や p33cdk2 以外の細胞周期制御因子の存在も考えられるが、今後の問題として残された。一方、SUP-T13 における抗 CD3 抗体による T 細胞受容体 (TcR) を介するアポトーシスは、S 期には入るが G2 期までは進行しないという報告もあり<sup>29)</sup>、細胞周期に依存するアポトーシスと依存しないアポトーシスが存在することが示唆された。また、TcR を介するアポトーシスと Fas を介するアポトーシスが異なる経路であるという我々の結果は、これに矛盾しないものと思われた。

細胞傷害性 T 細胞の多くはパーフォリンを分泌して細胞傷害活性を發揮しているが、Fas リガンド/Fas も細胞傷害性 T 細胞の細胞傷害活性機構の一つであることが報告された<sup>30)</sup>。Fas 耐性白血病細胞が細胞傷害性 T 細胞の傷害活性を逃れ、生物学的悪性化の理由になりうるとも考えられ、その意味でも Fas 抗原を介するアポトーシス刺激伝達機構の解析は重要な研究テーマであると思われる。Fas 抗原が免疫系におけるアポトーシス誘導に重要な役割を担っていることが明らかになってきたが、Fas 抗原を介するアポトーシス誘導の細胞内でのシグナル伝達機構や細胞周期との関連についてはまだ不明なことが多い。今回私共は、Fas 抗原を介するアポトーシスにおいて、p34cdc2 と p33cdk2 の減少および Rb の脱リン酸化が認められること、その機序としてユビキチン依存性プロテアーゼの関与が考えられること、また、Fas 抗原を介するアポトーシスでは細胞周期の逸脱は起きず、特定の細胞周期に依存しないという結果を初めて明らかにした。lpr, gld 変異マウスのような、Fas あるいは Fas リガンドの変異により引き起こされる免疫異常や自己免疫疾患がヒトにおいても存在する可能性もあり、Fas 刺激によってサイクリンキナーゼが減少することの詳細なメカニズムの解明も含め、今後ますます免疫細胞における Fas 抗原を介するアポトーシスの解析が重要であると考えられた。

## 5 結 論

Fas 感受性ヒト白血病性 T 細胞株における Fas 刺激に伴う細胞周期関連蛋白の変化, および正常ヒト活性化 T 細胞における細胞周期関連蛋白の発現を検討した。また, Fas 刺激に伴う細胞周期の動態を flow cytometry (FCM) を用いて検討した。さらに, Fas 抗原を介するアポトーシスと TcR を介するアポトーシス刺激伝達機構の比較を行った。

1) Fas 感受性ヒト白血病性 T 細胞株では Fas 刺激後, 経時的に p34cdc2 と p33cdk2 の減少および Rb の脱リン酸化が普遍的にみられたことから, それらが Fas 抗原を介するアポトーシスに関与していることが強く示唆された。また, その機序としてユビキチン依存性プロテアーゼの関与が考えられた。Fas 耐性株ではこの刺激伝達経路の欠落が考えられた。

2) 正常ヒト活性化 T 細胞におけるサイクリンキナーゼの発現は, p34cdc2 などの十分な発現がおき増殖活性が高くなってから Fas 感受性が発現することを裏付ける結果と思われた。

3) Fas 感受性ヒト白血病性 T 細胞株における Fas 刺激後の BrdU の取込みや DNA ヒストグラムの解析結果により, Fas 抗原を介するアポトーシスでは G1 期停止は起きず, S 期に進行した後アポトーシスに至ると考えられた。

4) SUP-T13 において, Fas 抗原を介するアポトーシスは TcR を介する経路とは異なる機序によるものと考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり御指導と御校閲をいただいた本学眼科学講座 中川喬教授ならびに本学病理学第 1 講座 菊地浩吉教授に深謝致します。

## 参 考 文 献

1. Wyllie A. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer* 1993, 6: 205-208.
2. Williams GT. Programmed cell death; Apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991, 6: 1097-1098.
3. Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJT. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic culture. *Nature* 1989, 33: 181-184.
4. Takahashi S, Maecker MT, Levy R. DNA fragmentation and cell death mediated by T cell antigen receptor/CD3 complex on a leukemia T cell line. *Eur J Immunol* 1989, 19: 1911-1919.
5. McConkey DJ, Hartzell P, Amador-Perez JF, Orrenius S, Jondal M. Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J Immunol* 1989, 14: 1801-1806.
6. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980, 28: 555-556.
7. Sellin KS, Cohen JJ. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol* 1987, 13: 3199-3206.
8. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993, 36: 847-849.
9. McConkey DJ, Aguilar-Santelises M, Hartzell P, Erickson I, Mellstedt H, Orrenius S, Jondal M. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 1991, 14: 1072-1076.
10. Nunez G, London L, Hockenberry D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer S. Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hematopoietic cell lines. *J Immunol* 1990, 14: 3602-3610.
11. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989, 24: 301-305.
12. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989, 16: 1747-1756.
13. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991, 6: 233-243.
14. Watanabe FR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992, 35: 314-317.
15. Takahashi S, Sato N, Takayama S, Ichimiya

- S, Sato M, Hyakumachi N, Kikuchi K. Establishment of apoptosis-inducing monoclonal antibody 2D1 and 2D1-resistant variants of human T cell lines. *Eur J Immunol* 1993, 2: 1935-1941.
16. Lotem J, Sachs L. Regulation by Bcl-2, c-myc, and p53 of susceptibility to induced competent and defective myeloid leukemia. *Cell Growth Differ* 1993, 4: 41-47.
17. Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol* 1993, 15: 621-627.
18. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 1992, 8: 879-886.
19. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991, 6: 879-888.
20. Mosser DD, Martin LH. Induced thermoresistance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line. *J Cell Physiol* 1992, 15: 561-570.
21. Lucas JJ, Terada N, Szepesi A, Gelfand EW. Regulation of synthesis of p34cdc2 and its homologues and their relationship to p110Rb phosphorylation during cell cycle progression of normal human T cells. *J Immunol* 1992, 148: 1804-1811.
22. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 1992, 11: 961-971.
23. Furukawa Y, Piwnicka-Worms H, Erust TJ, Kanakura Y, Griffin PJ. Cdc2 gene expression at G1 to S transition in human T lymphocytes. *Science* 1990, 250: 805-808.
24. Takahashi S, Doss C, Levy S, Levy R. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, is associated on the cell surface with the Leu-13 antigen. *J Immunol* 1990, 145: 2207-2213.
25. Oguri-Hyakumachi N, Takahashi S, Nakagawa T, Kikuchi K. Selective depletion of cyclin-dependent kinases is associated with Fas-mediated apoptosis in human leukemia T cell lines. *Int J Immunopharmacol* (in press)
26. Owen-Schaub LB, Yonehara S, Crump III WL, Grimm EA. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol* 1992, 140: 197-205.
27. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992, 149: 3753-3758.
28. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993, 75: 1169-1178.
29. Zhu L, Anasetti C. Cell cycle control of apoptosis in human leukemic T cells. *J Immunol* 1995, 154: 192-200.
30. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994, 265: 528-530.
31. Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 1994, 263: 1143-1145.
32. Norbury C, MacFarlane M, Fearnhead H, Cohen GM. Cdc2 activation is not required for thymocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 202: 1400-1406.
33. Vaux DL, Aguila HL, Weissman IL. Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int Immunol* 1992, 4: 821-824.
34. Owen-Schaub LB, Radinsky R, Kruzel E, Berry K, Yonehara S. Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Res* 1994, 54: 1580-1586.
35. Yonish-Rouach E, Grunwald D, Wilder S, Kimchi A, May E, Lawrence J, May P, Oren M. p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol* 1993, 13: 1415-1423.
36. Ryan JJ, Danish R, Gottlieb CA, Clarke MF. Cell cycle analysis of p53 induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* 1993, 13: 711-719.
37. Pines J. Ubiquitin with everything. *Nature* 1994, 371: 742-743.
38. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994, 79: 13-21.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学眼科学講座 小栗 直美